

## 乾燥粉末乳酸菌スターターの開発 (第2報) — 味噌用乳酸菌の乾燥化 —

浅野行蔵・吉川修司・富永一哉

### Fluidized-Bed Drying of Lactic Acid Bacteria for Food Starter (Part II) — Drying of Lactic Acid Bacteria for Soybean Paste Fermentation —

Kozo ASANO, Shuji YOSHIKAWA and Kazuya TOMINAGA

Soybean paste is a traditional Japanese food in which the main ingredient is soybeans fermented, most often, with *Zygosaccharomyces rouxii* or *Tetragenococcus halophila*. It has been reported that starters incorporating lactic acid bacteria effectively lighten the final color of the soybean paste and, in fact, lactic-acid-bacteria starters, supplied in liquid-culture form, are now being employed by Nagano Prefecture producers of soybean paste. A liquid culture, however, is difficult to preserve and transport. A starter in powder form is required to ease present handling and preservation problems.

This study investigated growing and dehydrating characteristics of *Tetragenococcus halophila* P3 as a precursor to using a fluidized-bed dryer to produce a starter for soybean paste. Although yeast extracts and high phosphate concentrations were found to be most effective in stimulating growth, the maximum viability of *Tetragenococcus* after dehydration remained a low 16.7%.

味噌の発酵には主として耐塩性酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) が関与しており、加えて、耐塩性乳酸菌 (*Tetragenococcus halophila*, 旧称 *Pediococcus halophilus*)<sup>1)</sup>とも発酵に寄与している。乳酸菌は発酵過程で酸化還元電位を還元側にする作用を持つため、明るい色調の優れた製品を製造できるとされる<sup>2)</sup>。しかし、乳酸菌をスターターとして添加しているのは一部の地域に限られ、一般的には原料に当初から付着していた乳酸菌や工場に棲み着いた蔵付き乳酸菌の自然増殖に依存している。スターターを利用している地域でも、供給形態は培養菌液のままの状態であり、スターターの保存性が乏しい。

したがって、取り扱いが容易で、保存性の良い乾燥乳酸菌スターターが実用化されれば、道産味噌の品質向上が期待できる。本研究では味噌用乳酸菌の培養条件の検討および、第1報で用いた流動層乾燥法による乾燥粉末スターターの試作を行ったので報告する。

### 実験方法

#### 1. 供使菌株

菌株は *T. halophila* (旧称 *P. halophilus*) JCM5888<sup>T</sup> (基準株), および信州味噌研究所より分与された味噌用乳酸菌 P3, P2, 3015 株を使用した。流動層乾燥によるスターターの試作には味噌用乳酸菌 P3 を用いた。

#### 2. 培地および培養条件

基礎培地	グルコース	2.0 %
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 %
	塩化ナトリウム	10.0 %
	Yeast Nitrogen base	0.67%
	pH	8.0

#### ・天然栄養源の検討

基礎培地に以下の天然栄養源をそれぞれ1%濃度になるように添加して、培養温度を30°Cとして生育を比較した。ポリペプトン, ポリペプトンS, 酵母エキス, ビーフエキス, トマトジュース, ただしトマトジュースは、10%添加した。また、各天然栄養源をすべて添加した培地も調製した。この場合は各天然栄養源の濃度はポリペ

プトン, ポリペプトンS, 酵母エキス, ビーフエキスが0.1%濃度, トマトジュースは1%濃度とした。

#### ・食塩濃度の検討

前述の基礎培地に酵母エキスを1%添加し, 塩化ナトリウム濃度を0~22%とした培地を用いた。他の条件は, 天然栄養源の検索実験に準じた。

#### ・培地の緩衝作用(リン酸濃度)の検討

リン酸塩の高濃度溶液を培地とは別に滅菌して, 4~20%濃度で下記の組成の基礎培地に添加して乳酸菌の生育を調べた。また, グルコースも滅菌処理による着色を防ぐために, 別に滅菌して添加した。

基礎培地	グルコース	5.0 %
	塩化ナトリウム	10.0 %
	酵母エキス	1.0 %
	ポリペプトンS	0.5 %
	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ・7 aq	0.01%
	pH	8.0

#### ・代謝産物による生育阻害の有無の検討

乳酸菌の主な代謝産物である乳酸を下記の組成の基礎培地に添加し, 代謝物質による生育阻害の程度を調べた。

*Tetragenococcus* 属乳酸菌は, L型の乳酸を主に生成することが知られている。そこで, 予め添加する乳酸は立体型を一致させるため, L-乳酸ナトリウムとして中和された化合物を添加した。乳酸菌の生育によって生成される乳酸量は3%に達するので, 添加する乳酸ナトリウムを1%, 2%, 3%とした。対象区はコハク酸を等モル添加した実験区とした。よって, 添加したコハク酸は, 2.6%, 5.2%, 7.8%とした。

基礎培地	グルコース	5.0 %
	塩化ナトリウム	10.0 %
	酵母エキス	1.0 %
	ポリペプトンS	0.5 %
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.4 %
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7 %
	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ・7 aq	0.01%
	pH	8.0

### 3. 濁度の測定

分光光度計(島津製作所 UV-1200)で波長660 nmにおける濁度を測定した。

### 4. 味噌用乳酸菌の流動層乾燥機による乾燥

基材はコーングリッツMS(大洋試料, 以後, コーングリッツ)を用いた。なお, コーングリッツは水分を3%まで乾燥させたものを用いた。保護剤はシュークロースの5~50%溶液を用いた。その他の流動層乾燥の方法・条件,

生残率の計算, および水分含量の測定方法は第1報と同様である。

### 5. 電子顕微鏡用試料の作成

電子顕微鏡用試料台に粉体を少量のせ, 定法により白金を蒸着して調製した。

## 結果および考察

### 1. 菌体生産のための培養条件の検討

菌体収量は製品コストに反映するので, 乳酸菌をより高濃度に培養できるように種々の条件を調べた。

まず, 生育を促進し, とくに最高生育濃度を高くするために効果のある天然栄養源を検索した。天然栄養源は, 酵母エキス添加区に顕著な効果が見られた。菌の増殖が始まると生育速度も速く, 最終の到達OD値も, 他の栄養素添加区と比べ良好であった。生育に伴い乳酸生成も盛んとなりpH低下も著しかった(Fig.1)。この酵母エキス添加の効果は, 実験した他の3株の乳酸菌(P 2,3015, JCM 5888<sup>T</sup>)に共通するものであった(データ省略)。

味噌用乳酸菌(*T. halophila*)は, 味噌のような高濃度の食塩が存在する環境でも生育可能な耐塩性菌とされているが, 培地中の食塩濃度と生育の関係を調べた(Fig.2)。培地中の食塩濃度が高くなるにしたがって生育のラグタイムは延滞した。特に10%を越えるとラグタイムは遅延し, 生育速度も遅くなった。食塩濃度が10%までは, 良好な生育速度を示した。しかし, 良好な生育の区でも $\Delta OD_{660} = 1.4$ 程度と菌体量は少なかった。濁度の上昇が少ない実験区ほどpHの低下も少なかった。以上より, 味噌用乳酸菌の培養には食塩濃度を10%以内とするのがよいと考えられた。

乳酸菌はリン酸濃度を増やし, 緩衝作用を増加してpHの低下を遅らせた場合の効果調べた(Fig.3)。リン酸濃度については, 味噌用乳酸菌は, 高濃度でも良く生育することが分かった。高濃度リン酸存在下では, 生育の最高速度は低くなる。しかし, 緩衝効果が高いため, pHの低下はずっと緩慢なものになり, 最終培地濁度は増加した。しかし, 濁度 $\Delta OD_{660} = 3.5$ 程度であり, 他の乳酸菌の生育濁度(7~10)と比較するとまだまだ低い。乳酸菌製剤のコスト低減のためには, さらに良い生育条件を探す必要がある。

乳酸ナトリウムによる生育阻害は, 予想に反し強いものではなく, 3日間の培養で濁度は $\Delta OD_{660} = 2$ 前後まで達した。コハク酸の阻害作用は, 乳酸よりやや強いもののある程度の生育は見られた(Fig.4)。このことは, 乳

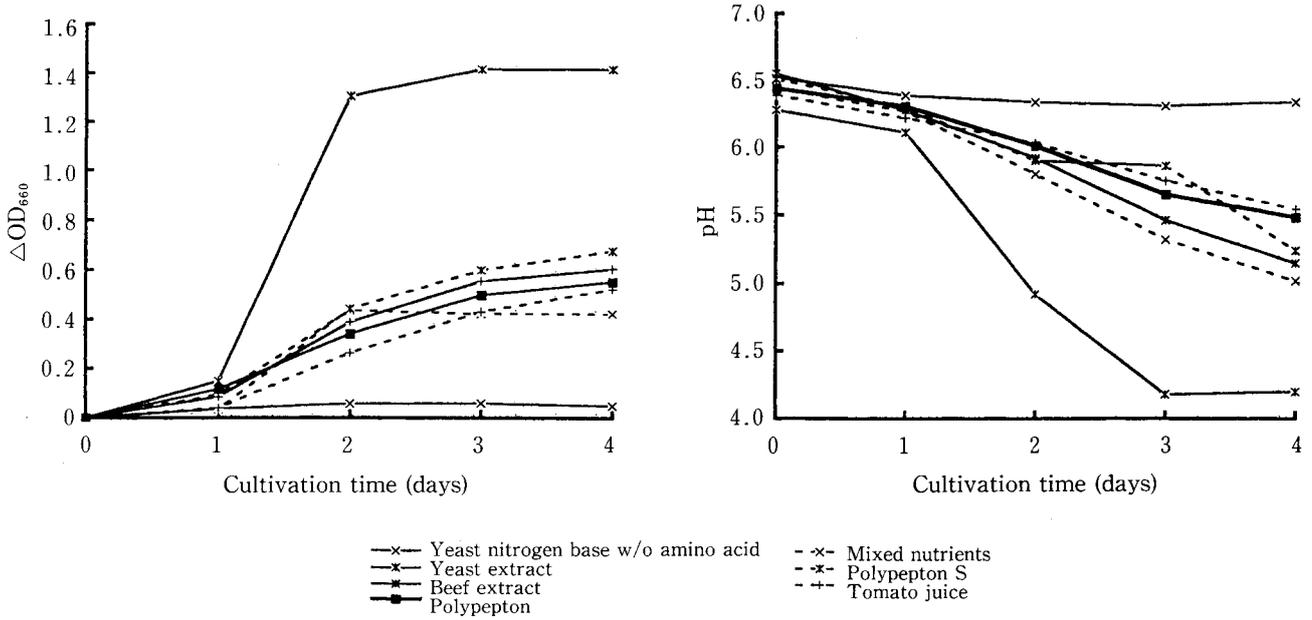


Fig.1 Changes in  $\Delta OD_{660}$  and pH of *Tetragenococcus halophila* P3 Cultured with various natural nutrients.

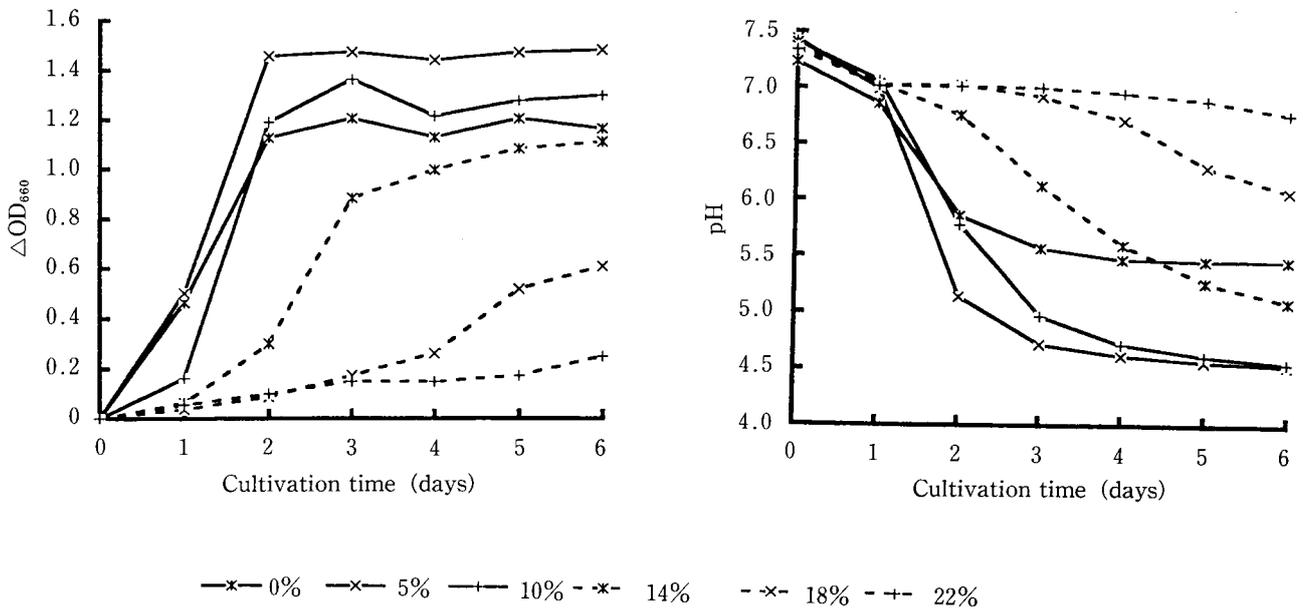


Fig.2 Changes in  $\Delta OD_{660}$  and pH of *Tetragenococcus halophila* P3 cultured with various sodium chloride concentrations.

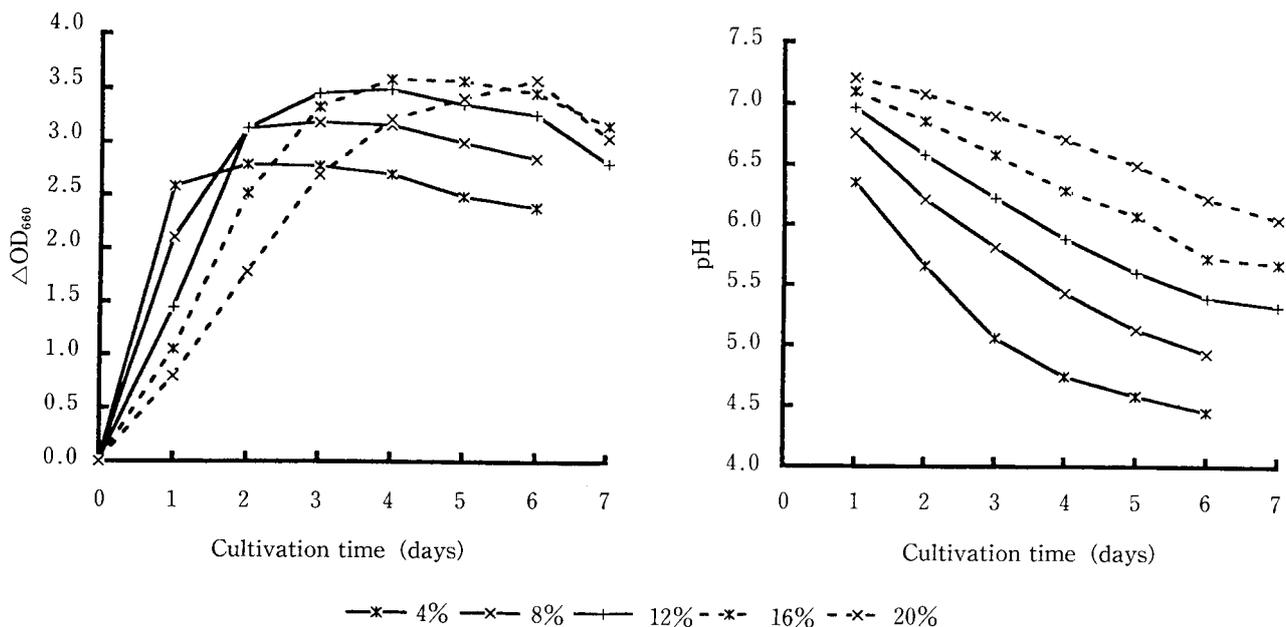


Fig.3 Changes in  $\Delta OD_{660}$  and pH of *Tetragenococcus halophila* P3 cultured with various phosphate concentrations.

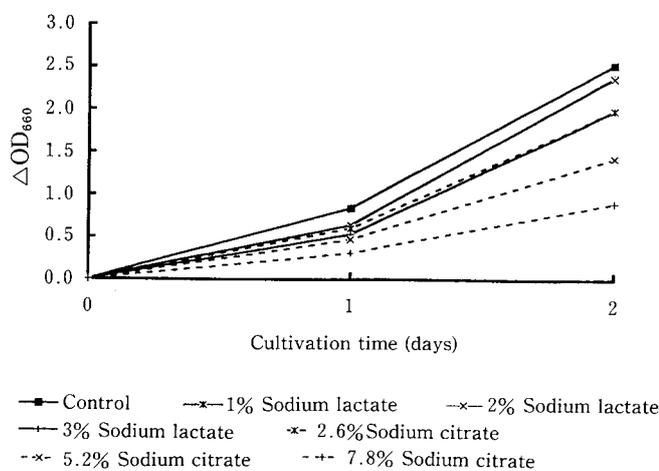


Fig.4 Changes in  $\Delta OD_{660}$  and pH of *Tetragenococcus halophila* P3 cultured with various lactate and citrate concentrations.

酸の培地中の蓄積によるフィードバック阻害は、さほど強くないことを意味している。乳酸菌の最高生育濃度を規定している要因はなにか興味を持たれる。

さらに、培養スケールを大きくして、より早い生育と最高生育濃度が高くなるような培養方法をジャーフェメンターを用いて検討を進めている。生育 pH をアンモニアで一定に制御して培養を行っているが、現在のところ最高生育濃度の向上は見られない（データ略）。

## 2. 味噌用乳酸菌の流動層乾燥機による乾燥

乾燥乳酸菌スターターの電子顕微鏡写真を Fig.5 に示した。写真の矢印で示されている乳酸菌が糖に埋まって

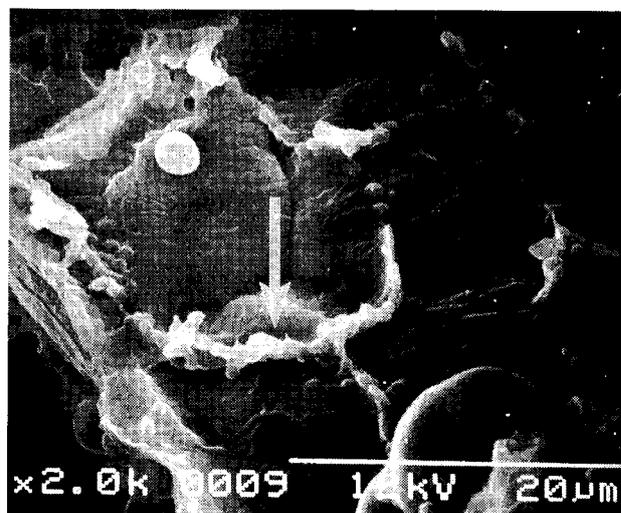


Fig.5 Surface of the dried starter Corn grits coated by sucrose. *Tetragenococcus* is indicated by the arrow.

いるのがわかる。

流動層乾燥における保護剤の種類および濃度が乳酸菌の生存率に与える影響を調べた。乳酸菌の生残率はシュクロース濃度が10%濃度までシュクロース濃度にほぼ比例し、30%で生残率が急に高まり、それ以上の濃度では生残率は一定の値となった (Fig.6)。このデータは、シュクロースを保護剤として味噌用乳酸菌を乾燥する場合には、保護剤濃度が乳酸菌の生残率を左右する大きなファクターであることを示している。しかし、生残率の最高値は16.7%と低く、今後は保護剤の種類や

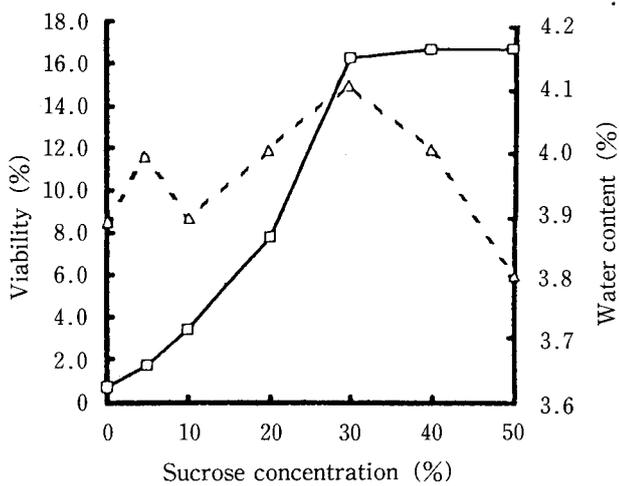


Fig.6 Viability of *Tetragenococcus. halophila* P3 and water content of starters after dehydration and treated with various sucrose concentrations.

濃度などを変えて、至適乾燥条件を探る予定である。

## 要 約

味噌用乳酸菌 (*Tetragenococcus* 属菌) のスターターを製造するため、培養条件を検討し、流動層乾燥における保護剤 (シュクロース) 濃度を検討した。同属菌の生育は一般に弱いため、培地成分を70種以上検討して、菌体収量の増加に努めた。この菌体を小型流動層乾燥機を用いて、保護剤濃度による生残率の変化を調べた。乳酸菌の生残率は保護剤濃度が30%の時に最高値16.7%を示した。生残率が低かったことから、保護剤の種類や濃度など乾燥条件のさらなる検討が課題として残った。

## 文 献

- 1) COLLINS, M.D., WILLIAMS, A.M., WALL-BANKS, S.: *FEMS Microbiology Letters*, **70**, 255 (1990)
- 2) 萱原久孝・安平仁美: 信州味噌研究所報告, **33**, 26 (1992)